

A.D

REC'D 03 SEP 1999

PCT/JP99/03837

日本国特許庁

16.07.99

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

EJKU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年 8月21日

出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第236164号

出願人  
Applicant(s):

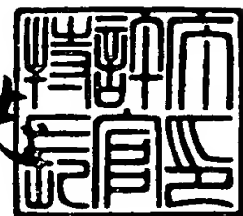
東 市郎  
林 昭  
住友製薬株式会社

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山田 健志



出証番号 出証特平11-3055062

【書類名】 特許願

【整理番号】 132524

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 35/74

【発明の名称】 乳化製剤の新規製造法

【請求項の数】 5

【発明者】

    【住所又は居所】 茨木市蔵垣内 1 丁目 3 番 4 5 号 住友製薬株式会社内

    【氏名】 濱松 典郎

【発明者】

    【住所又は居所】 茨木市蔵垣内 1 丁目 3 番 4 5 号 住友製薬株式会社内

    【氏名】 藤永 稔夫

【特許出願人】

    【識別番号】 592028019

    【氏名又は名称】 東 市郎

【特許出願人】

    【識別番号】 597032387

    【氏名又は名称】 林 昭

【特許出願人】

    【識別番号】 000183370

    【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100107629

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 中村 敏夫

    【電話番号】 06-466-5214

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 056546

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 乳化製剤の新規製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の工程を包含することを特徴とする、乳化製剤の製造法。

(a)細菌の菌体成分と油状物質、分散補助溶媒の混合液を攪拌し、

(b)細菌の菌体成分を分散する、

(c)分散補助溶媒を留去した後、

(d)界面活性剤を含む水溶液を加えて次の 2 段階乳化を行う

i) 低濃度の界面活性剤を含む水溶液を加えて緩やかに攪拌し粗乳化を行う、

ii) 適宜、所望の粒度分布を得るために、溶液の界面活性剤濃度を調整し強攪拌して本乳化を行う、

【請求項 2】 2 段階乳化において、粗乳化に使用される低濃度の界面活性剤水溶液の界面活性剤の含量が油状物質の 10%以下であることを特徴とする、請求項 1 記載の乳化製剤の製造法。

【請求項 3】 界面活性剤がポリソルベート 80 (Tween80) である、請求項 1 または 2 記載の乳化製剤の製造法。

【請求項 4】 細菌の菌体成分が BCG-CWS または ノカルジア・ルプラーの CWS である、請求項 1、2 または 3 記載の乳化製剤の製造法。

【請求項 5】 細菌の菌体成分が BCG-CWS であり、油状物質がスクワランである、請求項 1、2、3 または 4 記載の乳化製剤の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫賦活作用を有する細菌の菌体成分を有効成分とする癌免疫療法用乳化製剤に関しての、菌体成分を効率よく乳化製剤中に含有させることが可能な新規製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

癌の免疫療法剤として、細菌の菌体成分を有効成分とする癌免疫療法用製剤が知られており、特に BCG (Bacille Calmette-Guerin) 菌を用いての免疫療法剤は国際的にも広く用いられ多くの治療成績が蓄積されてきた。しかしながら、その臨床成績については、評価が分かれ、必ずしも有効な療法であるとは見なされていなかった (Cancer, 43, 1314-1319(1979)、Cancer Res., 39, 3262-3267(1979)、Cancer Res., 43, 5575-5579(1983)、Cancer Res., 45, 1413-1417(1989)、Cancer, 78, 1892-1898(1996))。

しかし最近になり、従来の免疫療法 (抗癌剤、放射線などの強力な免疫抑制効果を持つ治療法との併用療法) に疑問が提示され、BCG の細胞壁骨格成分 (Cell Wall Skeleton、以下、CWS と略す) を用いた単独治療によって、従来にない優れた成績が得られたことが報告されてきた (Pro.Japan Acad., 70, Ser.B 205-209(1994)、Pro.Japan Acad., 74, Ser.B 20550-55(1998))。

#### 【0003】

このように細菌の菌体成分を有効成分とする癌免疫療法用製剤の有用性が次第に明らかとなってきたが、この結果をさらに確立し、一般化するには次のような課題が存在した。即ち、上記の細菌の菌体成分は水、有機溶媒に不溶であるため、単独投与療法で使用された製剤は、用時調製で少量調製された乳化製剤であった。また、使用する油状物質の量が少ないこともあり、菌体成分を油状物質に分散する工程の機械化とスケールアップが困難であったため、BCG-CWS を用いる単独投与療法で優れた効果が出てはいたが、大量スケールでの製剤品としての製造方法が確立してはいなかった。それ故、従来公知の用時調製の製剤では、恒常的な安定生産は不可能であり、医薬品としての実用化が困難な状況であった。

#### 【0004】

そこで、従来公知の用時調製の製剤方法を改良し、工業的製造法を確立することが急務とされた。まず最初の検討で、BCG-CWS の原末を油状物質で充分被覆することが、菌体成分の生物活性 (マウスの腫瘍増殖抑制活性) を発揮するのに不可欠であることが見出された。

しかしながら、油状物質で充分被覆された BCG-CWS を用いて乳化製剤を

作成した場合、生物学的に活性な製剤が得られるものの、多くの菌体成分は、エマルションにならずに不溶性物質として乳化・分散機器の器壁等に付着するなどして残存した。それ故、菌体成分の有効利用が次に解決すべき課題として大きな問題となってきた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、従来、用時調製で、かつ、少量調製の癌免疫療法用の乳化製剤の製造方法を改良し、医薬品として有効な免疫賦活作用を維持した製剤品の実用的製造法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、油状物質で充分被覆されたBCG-CWSを用いて乳化製剤化の検討を鋭意進めた結果、乳化製剤調製後にエマルションにならずに乳化・分散機器の器壁などに残存する不溶性物質は、菌体成分を分散した油状物質が器壁などに強固に付着する性質を有することが原因であることを見出し、また、界面活性剤が付着を促進することも同時に見出した。そこで、使用する界面活性剤の濃度を工夫し、しかも、乳化工程を粗乳化と本乳化の2段階に分けて行うことで、乳化されずに不溶物として残存する菌体成分の量を激減させる製造法を確立するに至った。即ち、最初の粗乳化では、菌体成分の付着を促進しないような低濃度の界面活性剤を使用して緩やかに攪拌し乳化させる。その後、適宜所望の粒度分布を得るために必要最低限度の界面活性剤を加えて溶液全体の界面活性剤の濃度を調整し、強攪拌することによって所望の乳化製剤を作製するという2段階乳化方法が非常に有効であることが見出された。このような本発明の製造法で得られた乳化製剤では、不溶物として付着し残存する菌体成分はほとんどなく、使用されたBCG-CWSがほとんど乳化された製剤中に含有されていることが明らかとなった。即ち、乳化製剤中のBCG-CWSの含量は、乳化前の原末の仕込量とほぼ同量の値を示すことが明らかとなった。

【0007】

従って、本発明により、医薬品として有効な免疫賦活作用を維持した製剤品の

実用的な大量製造法が可能となり、細菌の菌体成分を使用したガン免疫療法用の乳化製剤を医薬品として使用することが可能となった。

【0008】

本発明の要旨は次のように示される。

(1) 以下の工程を包含することを特徴とする、乳化製剤の製造法。

(a) 細菌の菌体成分と油状物質、分散補助溶媒の混合液を攪拌し、

(b) 細菌の菌体成分を分散する、

(c) 分散補助溶媒を留去した後、

(d) 界面活性剤を含む水溶液を加えて次の2段階乳化を行う

i) 低濃度の界面活性剤を含む水溶液を加えて緩やかに攪拌し粗乳化を行う、

ii) 適宜、所望の粒度分布を得るために、溶液の界面活性剤濃度を調整し強攪拌して本乳化を行う、

(2) 2段階乳化において、粗乳化に使用される低濃度の界面活性剤水溶液の界面活性剤の含量が油状物質の10%以下であることを特徴とする、上記(1)記載の乳化製剤の製造法。

(3) 界面活性剤がポリソルベート80 (Tween80) である、上記(1)または(2)記載の乳化製剤の製造法。

(4) 細菌の菌体成分がBCG-CWSまたはノカルジア・ルプラーのCWSである、上記(1)、(2)または(3)記載の乳化製剤の製造法。

(5) 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである、上記(1)、(2)、(3)または(4)記載の乳化製剤の製造法。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明は製剤の製造方法であり、その特徴は、油状物質で充分被覆された菌体成分を使用して、乳化の際に、次の2段階乳化を行うことである。即ち、油状物質で充分被覆された菌体成分に、まず最初は、低濃度の界面活性剤を含有する水溶液を加えて分散・乳化機器で穏やかに攪拌し粗乳化処理を行う。その後、適宜所望の粒度分布を得るために界面活性剤をさらに加えて溶液全体の界面活性剤の

濃度を調整し、分散・乳化機で強撹拌することによって所望の水中油型エマルジョンを製造する。

この2段乳化方法により、使用した細菌の菌体成分が、ほぼ定量的に水中油型エマルジョン製剤に出来、ほとんど不溶物として残存しないようにすることが出来た。

#### 【0010】

本発明で使用可能な免疫賦活作用を有する菌体成分としては、微生物死菌や微生物由来のCWS、ムラミルヂペプチド(MDP)、リポ多糖(LPS)、マンナン、グルカンおよびこれらの誘導体等が挙げられる。微生物死菌の例としては、ヒト型結核菌の死菌などが挙げられる。CWSの由来微生物としては、マイコバクテリア属、ノカルディア属、コリネバクテリア属、プロピオニバクテリウム属などが挙げられる。中でも好ましい例として、マイコバクテリア属ウシ型結核菌であるBCGおよびノカルディア・ルブラーを挙げることができる。これらのCWSは、物理的に細菌を粉砕した後、除核酸、除タンパク、脱脂などの精製工程を経て得られる不溶性残渣として得られ、その製法自体は公知である。

なお、菌体成分の濃度は、乳化製剤時において0.01~10mg/mlになるように使用されることが好ましい。

#### 【0011】

本発明で使用可能な油状物質としては、Immunology第27巻、第311~329項(1974年)に記載されているような鉱物油、動植物油が挙げられる。鉱物油としては、流動パラフィン、バイオール(Bayol F)、ドラケオール(Drakeol)-6VRなどが挙げられる。植物油としては、落花生油、ゴマ油、AD-65(落花生油とアラセルとアルミニウムモノステアレートの混合物)等が挙げられる。動物油としては、スクワラン、スクワランのようなテルペノイド誘導体などが挙げられる。好ましい例としては、ドラケオール6VR、スクワランを挙げることができる。

なお、油状物質の濃度は、水中油型エマルジョン製剤において0.01~30%w/wの範囲が適当であるが、0.01~10%w/wが好ましく、0.01~5.0%w/wがより好ましい。



## 【0012】

本発明で使用可能な分散補助溶媒は、窒素気流下加熱あるいは減圧下などで簡単に留去可能な有機溶媒が挙げられる。好ましい有機溶媒としては、留去可能な有機溶媒であれば特に限定されるものではないが、その中でもICHの残留溶媒ガイドラインに記載のクラス2、クラス3の溶媒を挙げることができる。より好ましい溶媒として、例えばトルエン等の芳香族炭化水素、例えばシクロヘキサン等の脂肪族炭化水素、例えばジクロロメタン、クロロホルム、トリクロロエチレン等のハロゲン化炭化水素、例えばエタノール、イソプロパノール等の低級アルコール、例えば酢酸エチル等の酢酸エステル、例えばエチルエーテル等のエーテル類、例えばアセトン等のケトン溶媒を挙げることができる。好ましい溶媒としては、エタノール、イソプロパノール等の低級アルコール、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素、トルエン等の芳香族炭化水素を挙げることができる。より好ましいものとしては、エタノール、クロロホルム、トルエン等を挙げることができる。

溶媒を留去するための加熱温度としては、溶媒の沸点、蒸気圧に応じて適宜選択することが可能である。なお、高温になれば菌体成分の失活が生じるため、失活の生じない100℃以下の温度が望ましい。好ましくは80℃以下であり、70℃以下で行うことがより好ましい。

## 【0013】

本発明で使用可能な界面活性剤としては、医薬品製剤に使用される界面活性剤であれば特に制限されるものではない。例えばリン脂質、非イオン性界面活性剤などを挙げることができる。リン脂質としては、ホスファチジルアミン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、レシチン等を挙げることができる。また、水素添加されたリン脂質も使用することができる。非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（ポリソルベート20）、同モノパルミテート（ポリソルベート40）、同モノステアレート（ポリソルベート60）、同モノオレート（ポリソル

ベート 80)等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類およびソルビタンモノラウレート (Span 20)、同モノパルミネート (Span 40)、同モノステアレート (Span 60)、同モノオレート (Span 80)等のソルビタン脂肪酸エステル類などを挙げる事ができる。好ましい界面活性剤としては、卵黄ホスファチジルコリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、ポリソルベート 80を挙げる事ができる。より好ましくは、ポリソルベート 80が最も適している。

なお、2段階乳化に使用される界面活性剤を含有する水溶液の界面活性剤濃度は、まず、最初の粗乳化工程においては、界面活性剤濃度が界面活性剤の含有量として油状物質の約 10%以上になれば器具類等への菌体成分の付着が強固になる傾向があるため、ここで使用される界面活性剤の濃度は界面活性剤の含有量として油状物質の約 10%以下であることが望ましい。界面活性剤の使用量としては、好ましくは油状物質の 0.2~8%の範囲で使用する事が挙げられ、より好ましくは油状物質の 2~8%の範囲で使用する事を挙げる事ができる。従って、粗乳化工程で使用される低濃度の界面活性剤を含有する水溶液とは、界面活性剤の含有量として使用する油状物質の約 10%以下の値を示す水溶液のことである。

#### 【0014】

次いで、本乳化で調整のために使用される界面活性剤の量としては、所望の粒度分布を得るために必要最低限度の界面活性剤の量を使用する事が必要である。従って、場合によっては粗乳化工程時のままで、また場合によっては、最初の粗乳化工程で使用された界面活性剤濃度より高い濃度に溶液全体の濃度を調整することができる。溶液全体の界面活性剤濃度の調整に用いられる界面活性剤溶液の濃度としては、少量で調整が行うことが可能であればよく、例えば、ポリソルベート 80であれば、約 5~約 15%の界面活性剤濃度の水溶液を用いることができる。一方、本乳化工程では、溶液全体の界面活性剤の含有量が油状物質の約 10%以上であることが必要であり、好ましくは油状物質の約 10~約 20%の範囲の量となるように、高濃度の界面活性剤の水溶液で調整する事が挙げられる。より好ましくは油状物質の約 15~約 20%の範囲の量となるように界面活

性剤の含有量を調整することが挙げられる。このように、本乳化工程における界面活性剤濃度の調整とは、所望の粒度分布を有するエマルションが調製出来るように界面活性剤濃度を調整することである。

また、本乳化工程後に、適宜必要に応じて、さらに界面活性剤を加えて、より高含量の界面活性剤溶液に調整することもでき、その際、さらに乳化機による攪拌を行うこととで粒度分布をシャープなものにすることも可能である。これら水溶液には必要に応じて適宜安定化剤や等張化剤が加えられていてもよい。また、これら界面活性剤は一種類に限らず、適宜、数種類を組み合わせ使用することができる。

#### 【0015】

本発明で使用可能な等張液とは、エマルション粒子の分散媒体となるものであり、注射用水（注射用蒸留水）、生理食塩水などが挙げられるが、注射可能な分散溶媒であれば特に限定されない。また、等張にするための等張化剤としては、糖類、アミノ酸、ウレア、塩化ナトリウム等が挙げられる。糖類としては単糖類、二糖類、糖アルコールが挙げられる。単糖類としては、グルコース、フルクトース等、二糖類としては、マルトース、ラクトース、トレハロース、スクロース等、糖アルコールとしては、マンニトール、ソルビトール等が挙げられる。アミノ酸としては、アラニン、グリシン等が挙げられる。これら等張化剤は一種類に限らず、適宜、数種類を組み合わせ使用することができる。

なお、等張化剤の濃度は、水中油型エマルション製剤において0.1～30% w/wの範囲が適当であるが、1～20% w/wが好ましい。

その他、医薬品製剤に使用しうる安定化剤、酸化防止剤、防腐剤、緩衝剤等を必要に応じて添加することができる。添加濃度としては水中油型エマルション製剤において10% w/w以下で十分な場合が多い。

#### 【0016】

本発明で使用可能な分散・乳化機器としては、例えばPotter-Elvehjem型ホモジナイザー、ホモミキサー、超音波ホモジナイザー、マイクロフルイダイザー（商品名）、ナノマイザー（商品名）、アルティマイザー（商品名）、マントナーガウリンホモジナイザー型高圧ホモジナイザー、IKAウルトラタックスT-2

5 (商品名) 等の分散・乳化機により、分散もしくは乳化を行って所望の水中油型エマルジョン製剤を得ることが出来る。製造上の都合によっては、水中油型エマルジョンを調製後、賦形剤、安定化剤等の添加剤を添加しても良い。

乳化のための攪拌条件は、緩やかな攪拌条件としては、例えば、I K A ウルトラタックス T-25 (シャフトドライブ S25KV-25F) を使用した場合、回転数 5000~7000 rpm で乳化することが挙げられる。

また、強い攪拌条件としては、回転数 10000~25000 rpm で乳化することが挙げられる。乳化の温度としては、高温であることが望ましいが、水分の蒸発などを考えた場合、40~80℃程度が適当である。但し、使用する界面活性剤がポリオキシエチレンを結合したものである場合、その曇点を考慮した温度を設定することになる。

乳化の時間としては、調製するエマルジョンの粒度分布を粒度分布測定器で測定しながら、望む粒度分布が達成される時間を適宜選択することが出来る。

#### 【0017】

本発明製剤の菌体成分が油状物質で充分被覆されていることを確認する手段は、菌体成分に対してレクチンを作用させ、凝集反応が生じるか否かをチェックすることである。ここで使用される抗体様の物質としては、菌体成分の多糖類中の  $\alpha$ -D-マンノース残基、 $\alpha$ -D-グルコース残基を認識するレクチンであれば好ましく、例えば、コンカナバリン A、レンチル・レクチン、ビー・レクチン等のレクチン類が挙げられる。好ましいレクチンとしてはコンカナバリン A が挙げられ、このものは、マイコバクテリア属のアラビノガラクトンのアラビノース残基にも親和性を示すことが知られている (J. Bacteriology, 103, 422-425 (1970))。BCG-CWS はマイコバクテリア属であるウシ型結核菌 (BCG) の細胞壁成分であり、その構成成分としてアラビノガラクトンも含まれていることから、コンカナバリン A による認識を受ける。上記の性質から、凝集反応が無いことは、菌体成分が油状物質で充分被覆されているため、コンカナバリン A が反応しないようになっていると判断できる。

凝集反応の確認は、製剤品とレクチン (コンカナバリン A) の溶液を混合し、25℃で30分以上保存し、位相差顕微鏡などを用いて凝集反応の有無を確認す

ることができる。例えば、油状物質を含まない、菌体成分のみの製剤品の場合には、凝集反応が生じる（図1、参照例3の製剤品の凝集反応評価結果）。一方、菌体成分が油状物質で充分被覆されている本発明の製剤品の場合には、凝集反応が生じない（図2、実施例1の製剤品の凝集反応評価結果）。このように、凝集反応の有無を見ることで、油状物質での被覆の是非を見分けることができる。

## 【0018】

本発明に係る水中油型エマルジョン製剤は、注射など非経口で投与できる。投与形態は、治療目的などにより異なり、特に制限されるものではない。非経口的に投与する場合、通常用いられる投与形態として例えば、注射剤として皮膚より投与すること等ができる。

投与量、投与回数は対象とする疾患、患者の症状、年齢、体重、性別等によって異なるが、非経口投与する場合、特に注射剤として使用する場合には、通常は成人に対して週1回若しくは4週1回の投与で1回当たり10～250  $\mu$ gの範囲、好ましくは25～200  $\mu$ gの範囲を投与することができる。

## 【0019】

## 【実施例】

以下、実施例、試験例を挙げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明がこれらによってなんら限定されるものではない。

## 【0020】

## 実施例1

菌体成分としてBCG-CWS 100mgを、スクワラン 400mgとトルエン30mlの混合液に加え、振とうあるいは超音波により2～5分間分散した。その後、窒素気流下で50℃に加熱しトルエンを留去した。次いで、0.02%w/w ポリソルベート80水溶液 100mlを添加し、IKAウルトラタラックスT-25型ホモジナイザー（S25KV-25F）を用い、7000rpm 10分間65℃で粗乳化を行った。その後、10%W/Wポリソルベート80水溶液600  $\mu$ Lを添加し、IKAウルトラタラックスT-25型ホモジナイザーを用いて15000rpm 5分間65℃で本乳化した。本乳化後、さらに、10%W/Wポリソルベート80水溶液1200  $\mu$ Lを添加し、IKAウルトラタラッ

クス T-25 型ホモジナイザーを用いて 7000 rpm 10 秒間乳化を行い、水中油型エマルションを得た。

【0021】

実施例 2

菌体成分として BCG-CWS 500 mg を、スクワラン 2 g とトルエン 50 ml の混合液に加え、振とうあるいは超音波により 2～5 分間分散した。その後、窒素気流下で 50℃ に加熱しトルエンを留去した。次いで、0.02% w/w ポリソルベート 80 水溶液 500 ml を添加し、IKA ウルトラタラックス T-25 型ホモジナイザー (S25KV-25F) を用い、7000 rpm 10 分間 65℃ で粗乳化を行った。その後、10% W/W ポリソルベート 80 水溶液 3 mL を添加し、IKA ウルトラタラックス T-25 型ホモジナイザーを用いて 15000 rpm 10 分間 65℃ で本乳化した。本乳化後、さらに、10% W/W ポリソルベート 80 水溶液 6 mL を添加し、IKA ウルトラタラックス T-25 型ホモジナイザーを用いて 15000 rpm 5 分間乳化を行い、水中油型エマルションを得た。

【0022】

参照例 1 (一段階乳化法、分散溶媒なし)

菌体成分として BCG-CWS 4 mg とスクワラン 20  $\mu$ l (0.5% w/w) を Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーに加えて分散し、その後、0.2% w/w ポリソルベート 80 水溶液 4 ml を添加し、同ホモジナイザーで乳化し、水中油型エマルションを得た。

【0023】

参照例 2 (一段階乳化法、分散溶媒：トルエン)

スクワラン 400 mg を含有するトルエン 30 mL に、菌体成分として BCG-CWS 100 mg を加え、超音波により分散した。窒素還流によりトルエンを除去した後、0.2% w/w ポリソルベート 80 水溶液 100 mL を添加し、乳化機 (IKA T-25/S25KV25F シャフト使用) により、15000 rpm、5 min、70℃ にて乳化し、水中油型エマルションを得た。

【0024】

## 参照例 3 (オイルフリー調製法)

菌体成分として BCG-CWS 4 mg と 0.2%w/w ポリソルベート 80/5% マニトール水溶液 4 ml を Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーに加えて分散・乳化した後、60℃ 30 分間加温滅菌し、水中油型エマルションを得た。

【0025】

## 試験例 1 (BCG-CWS 原薬の製剤品中への取り込み率)

実施例 1、参照例 1、2 の製剤品 200  $\mu$ L を試験管に取り、5% フェノール水溶液 200  $\mu$ L を添加し攪拌する。濃硫酸 1 mL をさらに添加後攪拌した後、室温にて 30 分以上放置し、490nm にて吸光度を測定する。得られた吸光度から、予め作製した検量線を基に原薬量を計算する。(生化学実験講座 4 糖質の化学 下 P.370、Methods in Enzymology, 8, 93)

【0026】

その結果を以下の表 1 に示す。

【0027】

【表 1】

| 製剤製造方法 | 製剤中の原薬量<br>(対仕込値%) |
|--------|--------------------|
| 参照例 1  | 49                 |
| 参照例 2  | 16                 |
| 実施例 1  | 113                |
| 実施例 2  | 119                |

この表より示されるように、本発明の製造法で得られた製剤品の原薬取り込み率はほぼ定量的であると考えられる。このように、本発明製法により、製造中の不溶性物質の発生を抑制でき、原薬のロスを少なくできることが明らかとなった。

【0028】

## 試験例 2 生物活性試験

実施例及び参照例に記載の製剤を水により再溶解した水中油型エマルションについて、マウス腫瘍転移モデル系により生物活性を比較し、製剤方法の違いによる生物活性の変化を確認できる。

8 週齢の BALB/C マウス 5 匹を一群として使用する。マウスの尾静脈より  $2.5 \times 10^4$

個／匹のColon26-M3.1腫瘍細胞を投与し、24時間後に実施例および参照例の製剤品をBCG-CWSとして $100\mu\text{g}/200\mu\text{l}$ ／マウスを投与する。2週間後、開胸し、肺を摘出した後、肺に転移した腫瘍巣数を計数し比較を行うと、本発明の製剤品はいずれも生物活性を示している。

【0029】

【発明の効果】

本発明の製剤方法は、含有される菌体成分の有効な免疫賦活作用を維持し、かつ大量スケールで生産可能な製剤方法である。近年見直しが進みつつある免疫賦活療法、特に、BCG-CWSを用いる単独療法は特に優れた効果を挙げつつあり、本発明の製造方法により、初めて医薬品として有効な免疫賦活作用を維持した製剤品の実用的製造法を確立することができ、提供することにある。本発明の製剤方法では、菌体原薬の製剤品への取り込み率が高く、これにより初めて菌体成分を含有する製剤の大量スケールでの製造が可能になった。

【図面の簡単な説明】

【図1】参照例3の製剤品の凝集反応評価結果

【図2】実施例1の製剤品の凝集反応評価結果

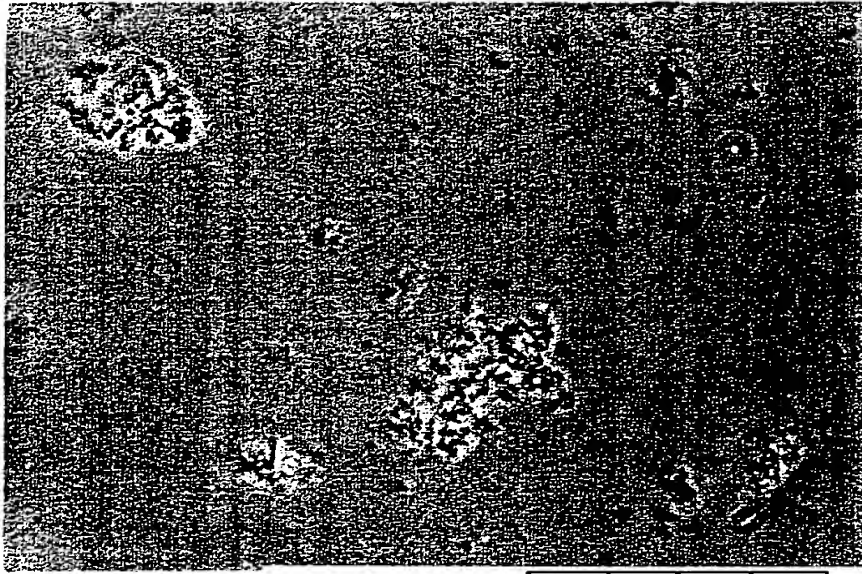
【図3】実施例2の製剤品の凝集反応評価結果



【書類名】

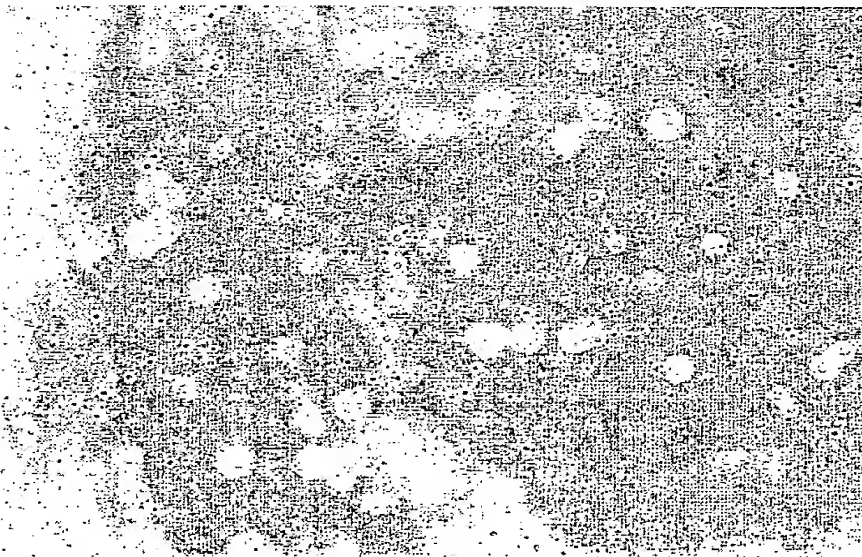
図面

【図1】



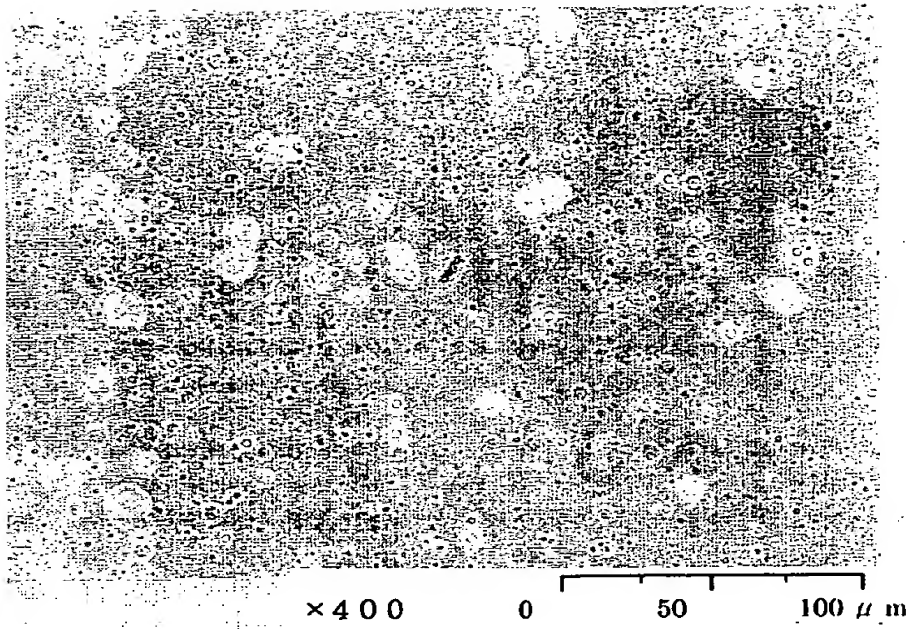
×400 0 50 100  $\mu\text{m}$

【図2】



×400 0 50 100  $\mu\text{m}$

【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 免疫賦活作用を維持し、大量スケールでの製造を可能にする新規な癌免疫療法用乳化製剤の実用的製造法を提供する。

【解決手段】 充分油状物質で被覆された菌体成分を使用して２段階乳化方法により生成効率の高い乳化製剤を得ることができた。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年 8月21日

【特許出願人】

【識別番号】 592028019

【住所又は居所】 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号

【氏名又は名称】 東 市郎

【特許出願人】

【識別番号】 597032387

【住所又は居所】 大阪府吹田市津雲台3丁目9番5号

【氏名又は名称】 林 昭

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100107629

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友製薬株式会社 法務部内

【氏名又は名称】 中村 敏夫

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [592028019]

1. 変更年月日 1991年12月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号  
氏 名 東 市郎

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597032387]

1. 変更年月日 1997年 3月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府吹田市津雲台3丁目9番5号

氏 名 林 昭

出願人履歴情報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号  
氏 名 住友製薬株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**